

Noves perspectives contra la Shigel·losis.

Is it the path that is difficult or is it difficult that is the path? [5]

Marina Cunquero Navarro*. Grau en Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona (Cerdanyola del Vallès).
*marina.cn@gmail.com



Introducció al Mecanisme Infectiu i la Resposta Immune

La immunitat de *Shigella* és serogrup-específica tot i que de vegades fins i tot serotip-específica. Hi ha diverses molècules bacterianes conegudes com immunògens. Els principals són el lipopolisacàrid (LPS) i l'antigen O. El LPS és l'objectiu principal de la immunitat adaptativa mentre que l'antigen O (O-Ag) és l'objectiu de la resposta immune protectora. Els serotips de *Shigella* es defineixen per l'estructura de la unitat de repeticició (RU) del O-Ag [4].

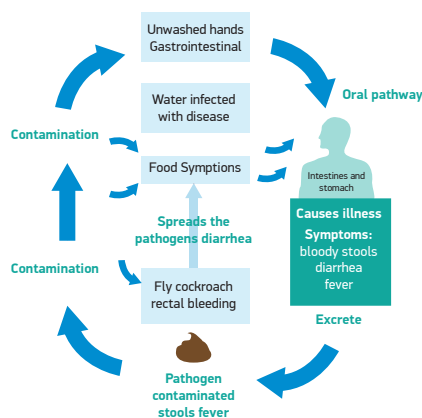


Figura 1. Esquema de la infecció per *Shigella* spp. La transmissió és fecal-oral. *Shigella* entra en el cos humà per ingestió d'aliments o aigües contaminades, arriba a l'estómac, passa per l'intestí prim i finalment arriba a l'intestí gruixut on establirà la infecció, principalment causant problemes al colon.

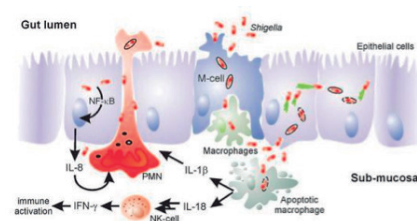
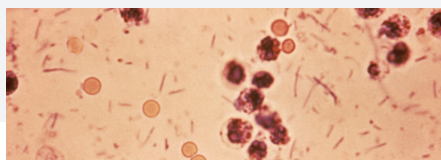


Figura 2 Patogènesi cel·lular de *S.flexneri*. El bacil travessa la capa de cèl·lules epitelials de l'intest per transciscar a partir de les cèl·lules M. Es troba amb els macròfags i induceix la seva apoptosi. La posterior lítil allibera senyalització proinflamàtoria com IL-18 i IL-18, entre d'altres. Aquestes activen la resposta immune innata involucrant els NK i atrauen els PMN. Finalment els PMN destrueixen el teixit epitelial al seu pas, cosa que augmenta la infecció en un principi, però finalment es resol fagocitant i matant els bacils de Shigella [5].



Imatge 1. Tíncio de Gram de *S. dysenteriae*. *Shigella* és un bacil Gram negatiu sense motilitat, anaeròbic facultatiu i intracel·lular que pertany a la família de les *Enterobacteriaceae* juntament amb *E. coli*. <http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/diseases/chinella.html>



Imatge 2. Imatge presa amb microscopi electrònic de *S.dysenteriae*. *Shigella* spp presenta quatre serogrupos: (A) *S.dysenteriae*, (B) *S.flexneri*, (C) *S.boydii* i (D) *S.sonnei*. Amb excepció de *S.sonnei*, tots els serogrupos presenten diferents serotips, cosa que complica el desenvolupament de vacunes. http://www.cis-science.org/oh_57-Shigella_dysenteriae Copyright Dennis Kunkel Microscopy

Metodologia

Es proposa la producció d'una vacuna atenuada oral que presenta una nova combinació de mutacions que dóna com a resultat una nova soca atenuada de *S.flexneri* 2a. Conté les següents mutacions: *ΔguaBA*, *ΔvirG* i *Δiuc*, totes elles deleccions de gens que confereixen la capacitat infectiva del bacteri. A partir d'un sistema de doble selecció positiva i negativa es seleccionen les soques mutants (Diagrama 1). Les mutacions s'introdueixen per *cassettes* que contenen: (i) la resistència a kanamicina (Km^R), per la selecció positiva, (ii) regions flanquejants dels gens a deleccionar per doble recombinació, i (iii) el gen *rpsL^{WT}*, que dóna lloc a la sensibilitat per l'estreptomicina (Sm^S) possibilitant la selecció negativa. Per tant, la soca de *S.flexneri* 2a haurà de ser *rpsL⁻*, conseqüentment, estreptomicina resistent (Sm^R).

Una vegada creat el mutant s'avalua la seva estabilitat per cultiu en línia cel·lular HeLa i es confirmen els mutants per PCR i seqüenciació de la regió cromosòmica [6]. Després de la confirmació es mesura la capacitat immunogènica en ratolins BALB/c amb una dosi de vacuna oral diferent. Passats 35 dies de la immunització es duu a terme la infecció experimental intranasalment a partir d'una dosi letal de 1×10^7 UFC de *S. flexneri* 2a crescuda en fase logarítmica i suspesa en PBS. El nombre de morts s'anota diàriament i es controla també el pes dels ratolins [8]. Es recullen mostres de sang i es mesura la resposta d'anticossos a partir d'un assaig ELISA en el qual es fixen O-Ag de la coberta de *S. flexneri* 2a que han sigut prèviament purificats per SDS-PAGE [7].

Beneficis

La creació d'una vacuna atenuada per l'infecció per *S.flexneri* 2a que combini les mutacions esmentades anteriorment permet obtenir una soca fortament atenuada que seria: (i) auxòtrofa per l'amino àcid guanina (*ΔguaBA*), (ii) incapaç de difondre intra i intercel·lularment per l'epíteli (*ΔvirG*) i (iii) incapaç de captar el ferro (*Δiuc*).

La combinació d'aquestes mutacions ha sigut provada anteriorment i ha donat resultats significatius [3]. La seva combinació proporcionaria més seguretat en l'atenuació de la soca. Amb aquesta vacuna s'aconseguiria protecció creuada front diferents serotips, ja que *S.flexneri* comparteix grups d'antigen amb d'altres serotips. A més, l'aplicació oral proporciona moltes avantatges, com la facilitat en l'administració.

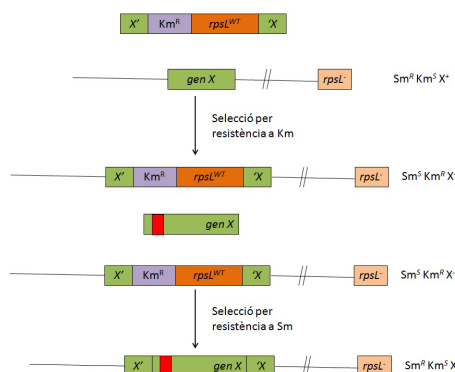


Diagrama 1 Diagrama del sistema de doble selecció positiva i negativa que es seguirà per l'obtenció dels mutants. *rpsL* i *rpsL*^{WT} representen, respectivament, una còpia mutada del gen que confereix resistència a la estreptomicina (Sm^r) i una còpia salvatge que dona lloc a la sensibilitat per l'estreptomicina (Sm^s). El sistema es basa en el fet que una cèl·lula merodiploïd pel gen *rpsL* és Sm^r mentre que una cèl·lula *rpsL*^{WT} és Sm^s. Finalment, *step by step*, s'hauran introduït les mutacions desitjades per resistència a la kanamicina i, després aquests s'hauran eliminat [11, 12].

Referències

- [1] J. L. J. Leberberg (1951). *Journal Bacteriology*, 61(5):549.
- [2] J. M. Reyat, V. Pelicic, B. Gicquel, R. Rapaport (1998). *Infection and Immunity*, 66:4011–4017.
- [3] M. M. Levine, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 31:334–355.
- [4] A. I. Phaliphan, L. A. Mulard, J. P. Sansnoton (2008). *Microbes and Infection*, 10:1057–1065.
- [5] G. N. Schroeder, I. H. Hilbi (2008). *Clinical Microbiology Reviews*, 21:134–156.
- [6] T. W. C. Grassel, M. M. Levine, I. E. M. Barry (2011). *Infection and Immunity*, 79:4912–4922.
- [7] A. I. Camacho, J. Souza-Rebouças, S. Sánchez-Gómez, M. Pardo-Ros, J. M. I. Jrache, C. Gamazo (2011). *Vaccine*, 29:8222–8229.
- [8] A. I. Camacho, J. Souza-Rebouças, J. M. I. Jrache, C. Gamazo (2012). *Methods*, 104:46–2023.